

Efecto lipolítico del Resveratrol en células 3T3-L1

Lipolitic effect of Resveratrol in cells 3T3-L1

Luis Gustavo Celis¹, Catalina Rozo¹, Jennifer Garay¹,
Diana Vargas¹, Fernando Lizcano¹

Resumen

Introducción: La obesidad es uno de los mayores factores de riesgo para la resistencia a la insulina y la aparición de la diabetes tipo 2. Las proteínas Sirtrinas, entre ellas la Sirtrina 1 (Sirt 1), tiene la capacidad de inhibir la expresión de los genes controlados por el receptor nuclear PPAR γ promoviendo la movilización de los ácidos grasos desde el adipocito y evitando su almacenamiento.

Objetivo: El propósito de este trabajo es evaluar la capacidad del Resveratrol como agente lipolítico en células adiposas diferenciadas.

Materiales y métodos: La adipogénesis se realizó mediante la incubación preadipocitos de ratón de la línea celular 3T3-L1 en presencia de un cóctel de diferenciación con Rosiglitazona, Isobutil Xantina y Dexametasona, y se llevaron a cabo observaciones cada dos días en el período comprendido entre los 0 y 10 días. Posteriormente, se aplicaron dosis de Rosiglitazona y Resveratrol y se realizaron nuevas observaciones hasta el día 6 para corroborar el efecto del Resveratrol.

Resultados y discusión: Los resultados obtenidos nos permitieron observar el efecto lipolítico del Resveratrol sobre las células adiposas dado que la cantidad de triglicéridos dentro de las mismas fue menor con respecto a las células diferenciadas y que no fueron tratadas con éste. Esto puede ser causado por la capacidad del Resveratrol de estimular la actividad de la Sirt 1 que a su vez provoca la inhibición del PPAR γ .

Conclusiones: Estos trabajos nos permitirán en el futuro desarrollar nuevas intervenciones en el tratamiento de la obesidad y sus complicaciones.

Palabras clave: Resveratrol, Sirtrinas, Rosiglitazona, Adipocito, adipogénesis, obesidad, diabetes tipo 2.

Fecha de recepción: 7 de mayo de 2008
Fecha de aceptación: 18 de julio de 2008

¹ Todos los autores pertenecen al Centro de Biología Molecular – Facultad de Medicina, Universidad de La Sabana (Bogotá, Colombia). luis.celis@unisabana.edu.co, catalina.rozo@unisabana.edu.co, jennifer.garay@unisabana.edu.co, diana.vargas5@unisabana.edu.co, fernando.lizcano@unisabana.edu.co

Correspondencia: Campus Universitario del Puente del Común Km. 21 Autopista Norte de Bogotá, D.C. Chía, Cundinamarca, Colombia.

Abstract

Introduction: The obesity it is one of the main risk factor for develop insulin resistance and type 2 diabetes, one component of calorie restriction in mammals it is given by Sirtuins proteins among them (SIRT 1), which have the capacity of inhibit the expression of the genes control by the nuclear receptor PPAR γ , promoting the mobilization of the fatty acids from the adipocyte and avoiding their storage.

Objective: The purpose of this work is to evaluate the capacity of Resveratrol (flavonoid found in grape skin) as a lipolytic agent on adipose cells differentiated by Rosiglitazone.

Materials and methods: Fibroblast preadipocyte adipogenesis was carried out using Rosiglitazone, incubating murine 3T3-L1 cells in the presence of a differentiation cocktail of Rosiglitazone, Isobutil Xantine and Dexametasona, monitoring between days 0 to 10 of differentiation every two days. Subsequently doses of Resveratrol and Rosiglitazone were added to each cells culture and followed up until day 6, to make sure the Resveratrol effect. The triglycerides quantification was performed qualitatively by red oil stain and quantitatively by isopropanol extraction and absorbance measurement at 510 nm.

Results and analysis: The results allowed us to see the Resveratrol lipolytic effect on the adipocyte cells, because the amount of triglycerides was lower than the cultures differentiated by Rosiglitazone. This could be caused by the Resveratrol capacity of stimulate the SIRT 1 activity, which also inhibit PPAR γ .

Conclusions: This kind of work will help in develop new interventions in the treatment of the obesity and complications.

Key words: Resveratrol, Sirtuins, Rosiglitazone, Adipocyte, Adipogenesis, Obesity, Diabetes type 2.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la obesidad se ha convertido en un problema de salud pública y un factor de riesgo para enfermedades como diabetes, cáncer de próstata, seno y colón, enfermedades cardíacas e hipertensión (1). Para entender la fisiopatología de esta enfermedad, es fundamental la comprensión de la fisiología de la célula de grasa tanto a nivel celular como molecular y así comprender las complicaciones que origina la obesidad.

La obesidad constituye un problema de salud pública tanto en Estados Unidos como en el resto del mundo, igualmente se presenta en los países propensos a la desnutrición. A nivel mundial 1,1 billones de adultos sufren de sobrepeso y de ellos 312 millones son obesos. Igualmente, esta enfermedad

está afectando a la población infantil, y se estima que hay unos 155 millones de niños con obesidad o sobrepeso. Una de las complicaciones derivadas de la obesidad es la diabetes; se estima que para el año 2030 se incremente en Estados Unidos y Canadá el número de casos con diabetes en 72%, mientras que en América Latina y el Caribe este incremento esté en el orden del 148% (2).

Al tratar de contrarrestar las causas que inducen enfermedades como la obesidad y la diabetes, se podrán diseñar estrategias que conduzcan a estilos de vida que disminuyan las complicaciones y secuelas que presentan estas patologías.

El Resveratrol (3,4',5-trans-trihydroxystilbeno) es un compuesto fenólico que se encuentra en la uva y en una variedad de plantas medicinales. Éste funciona como una

fitolexina que protege a las plantas contra infecciones por hongos (3). Sin embargo, puede tener otros efectos en células en cultivo, tales como inhibir el ciclo celular e inducir a la apoptosis vía la ruta de señalización MAP quinasa o por la inhibición de las proteínas involucradas en la traducción de las proteínas (3).

Otro efecto observado lo constituye la activación de la Sirt 1, promoviendo la movilización de los ácidos grasos en los adipocitos (3, 4), al igual que efectos antiinflamatorios, antioxidantes y cardioprotectores (5).

Uno de los componentes de la restricción calórica en los mamíferos está dada por la proteínas Sirtrinas (que son deacetilasas de Histonas dependientes de NAD^+), entre ellas la Sirtruina 1 (Sirt 1), que tiene la capacidad de inhibir la expresión de los genes controlados por el receptor nuclear PPAR γ , promoviendo la movilización de los ácidos grasos desde el adipocito y evitando su almacenamiento (4).

La activación de Sirt 1 disminuye los niveles de glucosa, aumenta la sensibilidad de la insulina, incrementa el número y la función de las mitocondrias, disminuye la adiposidad, aumenta la tolerancia al ejercicio, y potencialmente disminuye el peso corporal (6). Por otra parte, Sirt 1 permite responder a los adipocitos a perturbaciones en el metabolismo y en la regulación de la adiponectina (7).

Así mismo, actúa sobre la biogénesis mitocondrial reduciendo las especies reactivas del oxígeno (ROS) y previniendo el envejecimiento (8). También incrementa la resistencia al estrés oxidativo en el corazón, mediante el aumento de la actividad antioxidante a través de enzimas como la catalasa; sin embargo, a dosis altas puede producir cardiomiopatías

por lo que su administración en estas terapias anti envejecimiento debe ser cuidadosa (9).

El propósito de este trabajo es evaluar la capacidad del Resveratrol como agente lipolítico en células adiposas diferenciadas con Rosiglitazona.

METODOLOGÍA

Línea celular. Se utilizó la línea celular de fibroblastos (preadipocitos) de ratón 3T3L1 proveniente de la colección de cultivo tipo americano (ATCC), obtenida a partir de un extracto continuo de 3T3, caracterizada por ser células unipotentes y que tienen la capacidad de expresar receptores de insulina y que han sido ampliamente utilizadas como modelo para el estudio de la adipogénesis (10).

Cultivo celular. Se realizó el cultivo de líneas celulares 3T3-L1 (preadipocitos de ratón) en Medio Dulbecco Modificado (DMEM), Suero Bovino Fetal (FBS) al 10% y Penicilina y Estreptomomicina al 1% y se incuban durante 48 horas a una temperatura de 37°C y atmósfera con 95% de aire y 5% de CO_2 , formándose una monocapa.

Posteriormente, se realizan subcultivos mediante una digestión enzimática con tripsina 0,25% y EDTA 0,04% durante 3 minutos en incubadora de CO_2 y se siembran 3 cajas de cultivo celular por unas 48 horas para formar nuevamente una monocapa de células hasta alcanzar dos días postconfluencia.

Diferenciación celular. Para diferenciar las células 3T3-L1 se agrega un cóctel para inducir la diferenciación, que contiene 1 μM Rosiglitazona, 1 μM de Dexametasona para activar el factor de la transcripción $\text{C/EBP}\beta$ y 0.5 mM de Metil isobutil xantina, que incrementa los niveles de AMPc por inhibición de la fosfodiesterasa (11).

Luego de 48 horas se cambia el medio de cultivo + cóctel de diferenciación, por sólo medio de cultivo + Rosiglitazona. Esto para el mantenimiento de las células y eliminación de desechos.

Finalmente, se realizan observaciones a los 0, 2, 4, 6, 8 y 10 días después de la aplicación del cóctel de diferenciación y en este momento se añaden $50 \mu\text{M}$ de Resveratrol (4). Se realizaron nuevas observaciones hasta el día 6 para corroborar el efecto del mismo.

Determinación de triglicéridos. El proceso de lipogénesis en los adipocitos fue valorado mediante la cantidad de triglicéridos presentes en las células grasas por un método cualitativo que consiste en la tinción de las células con rojo aceite que colorea los triglicéridos (11) y por un método cuantitativo (12) mediante extracción de lípidos con 5 ml de isopropanol para luego leer la absorbancia del extracto a 510 nm en un biofotómetro Eppendorf.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un test de Análisis de Varianza (Anova) y las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando el valor de la media con error estándar ($\text{sem} \pm < 0.05$).

RESULTADOS

Los resultados obtenidos nos permitieron observar el efecto lipolítico del Resveratrol sobre las células adiposas, ya que la cantidad de triglicéridos dentro de las mismas fue menor con respecto a las células diferenciadas con Rosiglitazona y que no fueron tratadas con el mismo (Figuras 1 y 2).

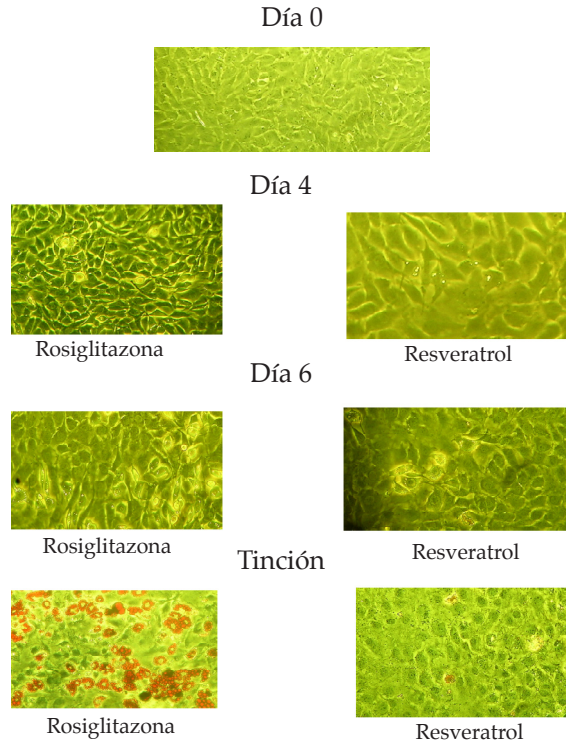


Figura 1. Efecto lipolítico del Resveratrol con respecto a la Rosiglitazona a los 0, 4, 6 y 8 (tinción) días.

Fuente: Datos de los autores.

CONCLUSIONES

En este estudio mostramos el efecto lipolítico de Resveratrol en células diferenciadas 3T3-L1. Varias líneas de evidencia sugieren que este compuesto es capaz de activar la expresión de la proteína Sirt 1, la cual juega un papel crucial en el metabolismo energético, puesto que modula la expresión de la insulina y la secreción de la adiponectina; adipocitoquina que fortalece la sensibilidad a la insulina (13,14).

En nuestro experimento diferenciamos totalmente las células 3T3-L1 y, posteriormente, 10 días post inducción, aplicamos $50 \mu\text{M}$ de Resveratrol. Luego de teñir las células para

cuantificar el contenido de triglicéridos, una fuerte reducción en grasa fue observada en las células tratadas con Resveratrol. Este efecto fue debido posiblemente a la activación de Sirt1 que actúa como un represor de genes que dirigen la diferenciación del adipocito y el almacenamiento de ácidos grasos (4,15).

mitocondriales, incluyendo los involucrados en la fosforilación oxidativa (15).

Dado que el Resveratrol tiene múltiples blancos es difícil comprender del todo en qué forma actúa sobre las Sirtrinas; una posibilidad es que estabiliza la unión de un

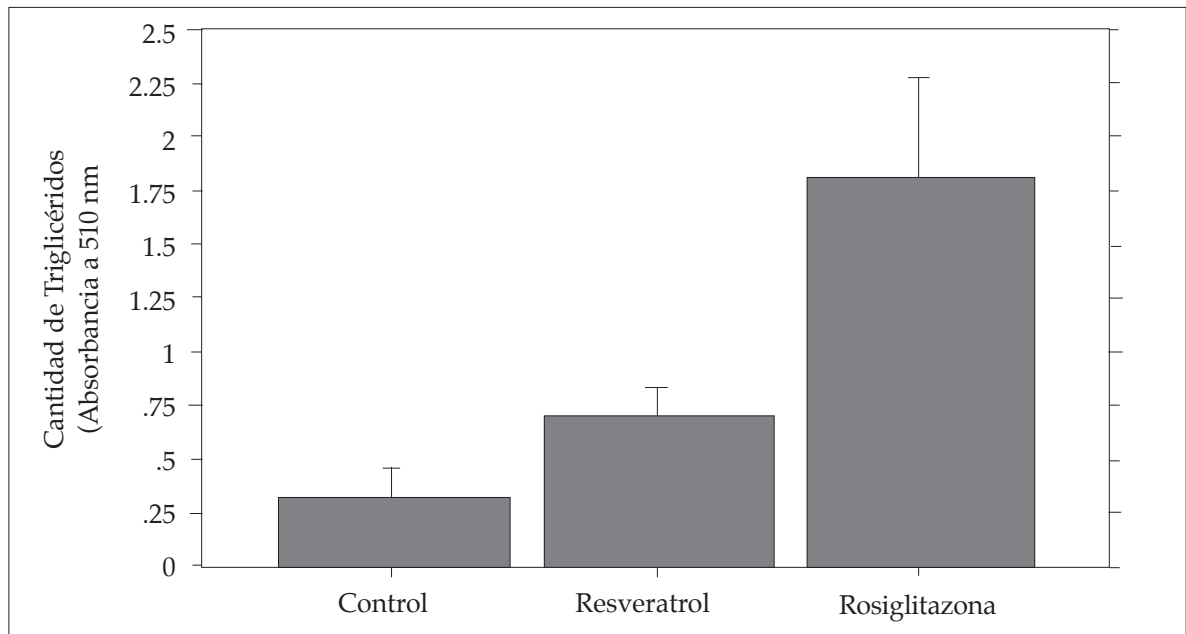


Figura 2. Cuantificación de lípidos en cada célula diferenciada con el respectivo medicamento. Rosiglitazona muestra tener una mayor concentración de lípidos en la célula en comparación con el Resveratrol (*) y el Control (°)

Estos resultados sugieren que la regulación positiva de esta proteína estimula la movilización de grasa en adipocitos 3T3-L1 totalmente diferenciados. Los mecanismos que explican esta acción no están del todo dilucidados; uno puede ser la capacidad del Resveratrol de inducir la actividad de la Sirt 1 como antes mencionamos, lo cual promueve su activación e inhibición del receptor nuclear PPAR γ ; otra alternativa es que incrementa la expresión de los genes

péptido fluoroforo a la Sirtuina que es necesario para su activación. Sin embargo, el mecanismo de acción por el cual el Resveratrol y otros polifenoles actúan sobre Sirt 1 sigue siendo desconocido (16).

Ha sido demostrado que Sirt1 se une a los sitios reguladores de genes dependientes de PPAR γ , que cumple un papel crucial en la activación de la adipogénesis y que además Sirt 1 se une directamente a PPAR γ en adipocitos maduros.

La explicación a esta hipótesis demostró que Sirt 1 interactúa con un co-represor de PPAR γ que posee actividad de-acetilasa de histona y molecularmente genera represión de la transcripción de genes dependientes de PPAR γ y que la actividad de-acetilasa de histona dependiente de NAD⁺ generada por Sirt1 no es suficiente para producir represión de PPAR γ , lo cual repercute en la movilización de grasa (4).

Algunos reportes indican que la utilización de Resveratrol a través de la activación de Sirt1 modula la función de PGC-1 α , un co-activador que induce biogénesis mitocondrial y activa genes comprometidos en grasa parda y termogénesis adaptativa, induciendo potencialmente la actividad mitocondrial e incrementando la tolerancia al frío; todos estos efectos son dependientes de la función de PGC-1 α (17,18).

Adicionalmente, estudios que profundicen en la caracterización molecular de Sirt 1 podrían vislumbrar una vía de conexión molecular entre el envejecimiento celular y la regulación metabólica (19). Estos trabajos nos permitirán en el futuro utilizar el Resveratrol, o sus análogos, para desarrollar nuevas intervenciones en el tratamiento de los pacientes con obesidad y sus complicaciones, tales como diabetes tipo 2 o resistencia a la insulina. Esto la convierte en una molécula de interés farmacológico de suma importancia y en especial por los múltiples blancos que posee, tales como las enzimas catalasa, xantina oxidasa y ciclooxigenasa - 2 (7, 20, 21, 22).

Un ejemplo de esto lo constituye los efectos citotóxicos que han sido encontrados en líneas celulares K β del tumor epidérmico nasofaríngeo humano, al igual que su efecto inhibitorio sobre la actividad de la xantina oxidasa (21).

Al tratar de contrarrestar las causas que inducen la obesidad y la diabetes se podrán diseñar estrategias que conduzcan a estilos de vida que disminuyan las complicaciones y secuelas que presentan estas enfermedades, y nuevas moléculas como el Resveratrol, capaces de regular la actividad de proteínas tan importantes dentro del metabolismo de lípidos como Sirt1, merecen el enfoque de amplias investigaciones.

Conflicto de intereses

Los autores declaramos no tener ningún conflicto de interés con alguno de los proveedores de los reactivos mencionados en el estudio.

Financiamiento

El financiamiento de este trabajo ha sido realizado con fondos propios de la Institución y todo lo escrito en el mismo es responsabilidad de los autores.

REFERENCIAS

1. Sánchez-Castillo CP, Pichardo-Ontiveros E, López, R.P. Epidemiología de la obesidad. *Gac Méd Méx* 2004; 140 (2): 3-20
2. Hossain P, Kowar B, El Nahas, M. Obesity and diabetes in the developing world-growing challenge. *Endocrine Reviews* 2006; 356 (3):213-215.
3. Alkhalaf M. Resveratrol-induced growth inhibition in MDA-MB-231 breast cancer cells is associated with mitogen-activated protein kinase signalling and protein translation. *European Journal of Cancer Prevention* 2007; 16 (4): 334-341
4. Picard F, Kurtev M, Chung N, Topark-Ngarm A, Senawong T, Machado de Oliveira R, Leid M, McBurney MW, Guarente L. Sirt 1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR γ . *Nature* 2004; 429: 771-776.
5. Baur JA, Sinclair D. Therapeutic potencial of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5: 493-566.

6. Elliot PJ, Jirousek M. Sirtuins: Novel targets for metabolic diseases. *Curr Opin Investig Drugs* 2008; 9 (4):371-378.
7. Qiang L, Wang H, Farmer SR. Adiponectin secretion is regulated by SIRT 1 and the endoplasmic reticulum oxidoreductase Ero1-L α . *Molecular and Cellular Biology* 2007; 27 (13): 4698-4707.
8. Guarente L. Sirtuins in aging and disease. *Cools Spring Harb Symp Quant Biol* 2008; 72:483-488
9. Alcendor RR, Gao S, Zhai P, Zablocki D, Holle E, Yu X, Tian B, Wagner T, Vatner SF, Sadoshima J. Sirt 1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart *Circulation Research* 2007; 100: 1512-1521
10. Student AK, Hsu RY, Lane MD. Induction of fatty acid synthetase synthesis in differentiating 3T3-L1 preadipocytes. *The Journal of Biological Chemistry* 1980; 225 (10): 4745-4750.
11. Fu M, Sun T, Bookout AL, Downes M, Yu RT, Evans RM, Mangelsdorf DJ. A nuclear Receptor Atlas: 3T3-L1 Adipogenesis *Molecular Endocrinology* 2005; 19(10):2437-2450.
12. Xiang-hui L, Zhang J, Sui S, Yang M. Effect of daidzin, genistin, and glycitin on osteogenic and adipogenic differentiation of bone marrow stromal cells and adipocytic trans-differentiation of osteoblasts. *Acta Pharmacologica Sinica* 2005; 26 (9): 1081-1086.
13. Kitamura YI, Kitamura T, Kruse JP, Raum JC, Stein R, et al. FoxO1 protects against pancreatic beta cell failure through NeuroD and MafA induction. *Cell Metab* 2005; 281: 53-163.
14. Qiao L, Shao J. SIRT1 regulates adiponectin gene expression through Foxo1-C/enhancer-binding protein alpha transcriptional complex. *Journal Biological and Chemistry* 2006; 281: 39915-39924.
15. Koo S-H, Montminy M. In *Vino Veritas: A tale of two Sirt1s?* *Cell* 2006; 127 (15): 1091-1093.
16. Sauve AA, Wolberger C, Schramm VL, Boeke JD. *The Biochemistry of Sirtuins Annu Rev Biochem* 2006; 75: 435-465
17. Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman B. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 1998; 92:829-839.
18. Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, et al. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1. *Cell* 2006; 127: 1109-1122.
19. Lin J, Handschin C, Spiegelman B. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metabolism* 2005; 1: 361-370.
20. Pirola L, Frôidô S. Resveratrol: One molecule, many targets *IUBMB Life* 2008; 60(5): 323-332.
21. Huang XF, Li HQ, Shi L, Xue JY, Ruang BF, Zhu HL. Synthesis of Resveratrol analogues, and evaluation of their cytotoxic and Xanthine oxidase inhibitory activities. *Chem Biodivers* 2008; 5(4):636-642
22. Zykova TA, Zhu F, Zhai X, MA WY, Ermakova SP, Lee KW, Bode AM, Dong, Z. Resveratrol directly targets Cox-2 to inhibit carcinogenesis. *Mol Carcinog* 2008; 9999 (9999) Recuperado el 28 de mayo de 2008. Disponible en: <http://www3.interscience.wiley.com/journal/117949900/abstract>